

# **Efecto de los factores edafoclimáticos y la especie de pasto en la diversidad de bacterias diazotróficas<sup>◇</sup>**

## **Effect of the edaphoclimatic factors and pasture species on the diversity of diazotrophic bacteria**

María F. Garrido<sup>1</sup>, Diana M. Cárdenas<sup>2</sup>, Ruth R. Bonilla<sup>3</sup> y Vera L. Baldani<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- CORPOICA. Bogotá, Colombia*

*E-mail: mgarrido@corpoica.org.co*

<sup>2</sup>*Departamento de Biología, Universidad Francisco de Paula Santander. Cúcuta, Colombia*

<sup>3</sup>*Laboratorio de Microbiología de Suelos-CORPOICA, Bogotá, Colombia*

<sup>4</sup>*EMBRAPA Agrobiología. Seropedica-Brasil*

### **Resumen**

Con el objetivo de estudiar la diversidad de las bacterias diazotróficas asociadas a los suelos y los pastos cultivados en las microrregiones Valle y Sabana del Cesar, se realizaron los recuentos de los géneros de bacterias (*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Derxia*, *Beijerinckia* y *Azotobacter*) asociadas a tres gramíneas (*Panicum maximum*, *Dichanthium aristatum* y *Brachiaria* sp.) en dos épocas climáticas (lluvia y sequía). El recuento fue realizado a partir de muestras de suelo rizosférico, raíces y hojas en medios de cultivo semiespecíficos sólidos (LG, LGD y BEIJERINCKIA) y semisólidos (NFb, LGI, JNFb, JMV, LGI-P), utilizando un diseño de parcelas divididas con un arreglo factorial de 3 (especies de pasto) x 3 (estratos) x 2 (épocas climáticas). Los resultados mostraron que la condición de sequía influyó en el número de bacterias diazotróficas presentes en las tres gramíneas utilizadas en la alimentación bovina del Valle y Sabana del Cesar, Colombia. En la época de sequía se observó una disminución del número de bacterias en las raíces y en el suelo.

Palabras clave: Bacterias diazotróficas, *Brachiaria* sp., *Dichanthium aristatum*, fijación del nitrógeno, *Panicum maximum*

### **Abstract**

In order to study the diversity of diazotrophic bacteria associated to soils and cultivated pastures in the Cesar Valley and Savanna microregions, the recounts of the bacteria genera (*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Derxia*, *Beijerinckia* and *Azotobacter*) associated to three grasses (*Panicum maximum*, *Dichanthium aristatum* and *Brachiaria* sp.) were made in two seasons (rainy and dry season). The recount was made from samples of rhizospheric soil, roots and leaves in solid (LG, LGD and BEIJERINCKIA) and semisolid specific culture media (NFb, LGI, JNFb, JMV, LGI-P), using a divided plot design with a 3 (pasture species) x 3 (strata) x 2 (seasons) factorial arrangement. The results showed that the drought condition influenced the number of diazotrophic bacteria present in the three grasses used in cattle feeding in the Cesar Valley and Savanna, Colombia. In the dry season a decrease was observed in the number of bacteria in the root and soil.

Key words: *Brachiaria* sp., diazotrophic bacteria, *Dichanthium aristatum*, nitrogen fixation, *Panicum maximum*

---

<sup>◇</sup> Parte de la Tesis de Maestría del primer autor, presentada en la Maestría de Biología Aplicada, Universidad Militar Nueva Granada.

## Introducción

En el departamento del Cesar aproximadamente 1 500 000 ha son dedicadas a la ganadería, con una población bovina de 1 450 000 cabezas que contribuyen con una producción diaria de 900 000 L de leche. Sin embargo, esta actividad económica está limitada por un proceso de degradación de las praderas que se manifiesta en la baja producción y calidad del forraje, situación derivada de la pérdida de la fertilidad del suelo, la cual según Oliveira *et al.* (2004) está asociada a la disponibilidad de N. Para suplir la deficiencia de este nutriente se ha recomendado la fertilización nitrogenada de síntesis, la cual no es viable por los altos costos ambientales, económicos y sociales.

La fijación biológica de nitrógeno constituye la principal vía de incorporación de N al ecosistema, que de forma constante es reciclado hacia la atmósfera principalmente por la acción de los organismos denitrificadores en el suelo (Baca *et al.*, 2000). En este sentido, como opción tecnológica se avizora la utilización de microorganismos nativos fijadores de nitrógeno con el propósito de reducir la aplicación de fertilización nitrogenada de síntesis, disminuir la contaminación de los suelos y aguas freáticas, bajar los costos de producción y mejorar la competitividad de los sistemas ganaderos. Para este fin se han utilizado los procesos de aislamiento y multiplicación de microorganismos diazotróficos en medios de cultivo libre de nitrógeno; en este sentido, los medios semisólidos han sido la clave para el aislamiento de un gran número de diazotrofos asociativos (Döbereiner *et al.*, 1995).

En el departamento del Cesar no existen estudios de evaluación de poblaciones de microorganismos fijadores de nitrógeno asociados a las pasturas, ni de su dinámica. Esto reviste especial importancia, teniendo en cuenta que la población microbiana está condicionada por la vegetación nativa y es posible que las diferentes especies de pastos puedan presentar un efecto selectivo sobre ella. Este hecho podría resultar en diferentes respuestas en cuanto a la contribución de la fijación biológica de nitrógeno por cada uno de estos microorganismos (Reis *et al.*, 2004). El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad de las bacterias diazotróficas y su interacción con diferentes gramíneas durante los cambios climáticos que se presentan en el departamento del Cesar.

## Materiales y Métodos

*Área de estudio.* La microrregión Valle del Cesar situada entre los 9°34' y 11°11' de latitud norte y los 74°4' y 72°31' de longitud oeste del meridiano de Greenwich, en el departamento del Cesar, tiene una extensión de 1 038 052 ha, donde se encuentran establecidos los cultivos de *Panicum maximum* y *Dichanthium aristatum*, en suelos con pH de 6,6 y un contenido menor que 2% de materia orgánica, el cual es considerado bajo. Entre tanto la sabana del Cesar (507 457 ha), establecida con cultivo de *Brachiaria* sp., posee suelos con un pH de 4,5 y contenido medio de materia orgánica (2-2,5%). El presente estudio se realizó en fincas de los municipios de Chiriguaná y Agustín Codazzi, representativos de las condiciones edafoclimáticas de las microrregiones Sabana y Valle del Cesar, zonas ganaderas del departamento del Cesar.

*Determinación del efecto de dos épocas climáticas sobre las poblaciones de bacterias diazotróficas en pastos del Valle y Sabana del Cesar.* Se tomaron muestras de suelo rizosférico y de la planta completa del pasto guinea en la época de lluvia en septiembre de 2006 (158,6 mm de precipitación y 28,1°C de temperatura) y en la de sequía en febrero de 2007 (0 mm de precipitación y 31° C de temperatura). Se muestrearon dos especies de pasto en la zona del valle (*P. maximum* y *D. aristatum*) y una en la sabana (*Brachiaria* sp.), a 20 cm de profundidad; se obtuvieron cinco submuestras de 200 g cada una, las cuales fueron homogenizadas para formar una muestra que fue procesada en el laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Biotecnología y Bioindustria (Corpoica, C.I. Tibaitatá).

El suelo rizosférico se obtuvo al removerlo de las raíces, a partir del cual se realizaron diluciones hasta 10<sup>-6</sup> en solución salina al 0,85% de NaCl. Se inocularon 0,1 mL de cada dilución en tres viales de medio semisólido Nfb, LGI, JNfb, LGI-P y JMV semiselectivo para el aislamiento de *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Burkholderia*, respectivamente (Döbereiner *et al.* 1995) como representantes de las bacterias diazotróficas microaerófilas asociativas. Así mismo, se inocularon 100 µL

en cajas de agar LG para el recuento de *Azotobacter*, LGD para *Derxia*, y *Beijerinckia* (BEIJ) para *Beijerinckia*, bacterias diazotróficas de vida libre (Döbereiner *et al.*, 1995).

Las raíces se lavaron, se cortaron en fragmentos y se desinfectaron con alcohol de 70° durante 1 min, después se sumergieron en hipoclorito de sodio al 2% (2 min.) y se enjuagaron dos veces en agua estéril. Se pesó 1 g de estas raíces y se maceraron en 9 mL de solución salina estéril (0,85% de NaCl). Las hojas y los tallos se lavaron con agua destilada y se secaron. Se pesó 1 g de este material vegetal cortado en fragmentos, se desinfectaron con alcohol de 70° y se maceraron en 9 mL de solución salina estéril (0,85% de NaCl). Se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  a partir de estos macerados y se inocularon en medios semisólidos (NFb, LGI, JNFb, LGI-P y JMV), de igual forma que la muestra de suelo rizosférico. Los viales inoculados se incubaron durante cinco días a 32°C, hasta la formación de una película subsuperficial como indicativo del crecimiento positivo. Se cuantificó la población de diazotróficas microaerófilas mediante el método del Número Más Probable para tres tubos, aplicando la tabla de McCrady (Döbereiner *et al.*, 1995). El diseño experimental fue en parcelas divididas con arreglo factorial de 2 (épocas climáticas) x 3 (especies de pastos) x 3 (estratos) y tres repeticiones; se hizo un análisis de varianza y se empleó la prueba de comparación de Duncan al 5% de probabilidad, utilizando el programa estadístico SAS versión 9.1.3. El análisis de varianza para las diazotróficas de vida libre se realizó bajo el mismo diseño experimental de 2 (épocas climáticas) x 3 (especies de pastos).

### Resultados y Discusión

Según el análisis de varianza se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) para las diferentes condiciones edafoclimáticas y los tres géneros de pastos del Valle y Sabana del Cesar, en las poblaciones de algunos géneros bacterianos diazotróficos microaerófilos y de vida libre (tabla 1).

Tabla 1. Relación entre los tratamientos y las variables evaluadas en la población de bacterias diazotróficas del departamento del Cesar.

Table 1. Relationship among the treatments and the evaluated variables in the population of diazotrophic bacteria in the Cesar department.

Tratamiento	<i>Azospirillum</i>	<i>A. amazense</i>	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Brachiaria</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Derxia</i>	<i>Beijerinckia</i>
Pasto	*	ns	*	ns	ns	*	*	*
Época	*	*	*	ns	*	*	*	*
Estrato	ns	ns	*	ns	ns	na	na	na
Pasto	*	ns	ns	ns	ns	*	*	*
Época								
Pasto	*	*	*	*	*	na	na	na
Estrato								
Época	*	*	ns	ns	*	na	na	na
Estrato								
Pasto	*	ns	*	*	*	na	na	na
Época								
Estrato								

\* Estadísticamente significativo ( $P \leq 0,05$ ); ns: no significativo; na: no aislamiento

*Poblaciones de bacterias diazotróficas en tres pastos del Valle y Sabana del Cesar.* El factor especie de pasto cultivado influyó significativamente en la población de las bacterias microaerófilas del género *Azospirillum* en medio semisólido NFb y *Herbaspirillum* en medio semisólido JNFb; se observó un mayor valor en el pasto *D. aristatum*, con respecto a *Brachiaria* sp. y *P. maximum* (tabla 2). Por su parte, los tres géneros bacterianos de diazotróficas de vida libre presentaron diferencias significativas según la especie de pasto cultivada y los mayores valores se registraron en el pasto *P. maximum*, seguido de *Brachiaria* sp. y *D. aristatum* (tabla 3).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Rodrigues *et al.* (2006), quienes observaron que las poblaciones de bacterias diazotróficas difirieron de acuerdo con las variedades de arroz cultivadas y los tipos de suelo donde se realizaron sus estudios. Así mismo, Reis *et al.* (2000) aislaron bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* y *Herbaspirillum* en cuatro genotipos de caña de azúcar, y encontraron variaciones en las poblaciones de estos microorganismos de acuerdo con el genotipo en estudio. Esto permite

señalar que tanto la especie como sus variedades influyen directamente en las poblaciones de microorganismos diazotróficos, lo que favorece el crecimiento de diferentes géneros, de acuerdo con las características del microhábitat desarrollado en una planta, según su eficiencia fotosintética, la disponibilidad de los nutrientes, la resistencia a las condiciones desfavorables, la producción de exudados, el pH del suelo y la materia orgánica, entre otras características (Bürgmann *et al.*, 2005).

Tabla 2. Número de células de diazotróficas microaerofílicas ( $g^{-1}$ ) en tres pastos.

Table 2. Number of cells of microaerophilic diazotrophs ( $g^{-1}$ ) in three pastures.

Pasto	<i>Azospirillum</i> (NFb)	<i>A. amazonense</i> (LGI)	<i>Herbaspirillum</i> (JNFb)	<i>Burkholderia</i> (JMV)	<i>Gluconacetobacter</i> (LGI-P)
<i>D. aristatum</i>	6,14 <sup>a</sup>	5,85	5,86 <sup>a</sup>	5,20	4,88
<i>Brachiaria</i> sp.	5,83 <sup>b</sup>	5,40	5,24 <sup>b</sup>	4,88	5,04
<i>P. maximum</i>	5,59 <sup>b</sup>	5,58	5,43 <sup>b</sup>	5,22	4,77

Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias de tres repeticiones. Medias seguidas con la misma letra en cada medio evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

Tabla 3. Unidades formadoras de colonias (UFC)  $g^{-1}$  de diazotróficas de vida libre en tres pastos.

Table 3. Colony forming units (CFU  $g^{-1}$ ) of free-living diazotrophs in three pastures.

Pasto	<i>Azotobacter</i> (LG)	<i>Derris</i> (LGD)	<i>Beijerinckia</i> (BEIJ)
<i>Paricum maximum</i>	6,45 <sup>a</sup>	6,15 <sup>a</sup>	5,73 <sup>a</sup>
<i>Brachiaria</i> sp.	5,88 <sup>a</sup>	5,67 <sup>b</sup>	5,30 <sup>ab</sup>
<i>Dichanthium aristatum</i>	4,82 <sup>b</sup>	5,36 <sup>b</sup>	4,83 <sup>b</sup>

Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias de tres repeticiones. Medias seguidas con la misma letra en cada medio evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

Cuando se analizaron las poblaciones de diazotróficas en los tres estratos (suelo rizosférico, raíces y hojas) en los cuales sólo se estudiaron los géneros microaerofílicos (que también son considerados microorganismos endófitos capaces de colonizar el interior de los tejidos radicales y foliares), se encontraron diferencias ( $P \leq 0,05$ ) para la población de las bacterias en las hojas de *D. aristatum* y *P. maximum*, las cuales presentaron el mayor valor con respecto a las raíces y el suelo rizosférico. Sin embargo, en *Brachiaria* sp. las raíces registraron la más alta población bacteriana (tabla 4).

Tabla 4. Población de diazotróficas microaerofílicas en los estratos de tres pastos.

Table 4. Population of microaerophilic diazotrophs in the strata of three pastures.

Pasto	Estrato	<i>Azospirillum</i>	<i>A. amazonense</i>	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Gluconacetobacter</i>
<i>D. aristatum</i>	Hojas	7,07	6,75	6,96	6,1	5,89
	Raíces	5,58	5,13	5,15	4,97	4,11
	Suelo	5,81 <sup>b</sup>	5,68 <sup>ab</sup>	5,47 <sup>b</sup>	4,53 <sup>b</sup>	4,65 <sup>b</sup>
<i>Brachiaria</i> sp.	Hojas	4,66 <sup>c</sup>	4,53 <sup>ab</sup>	4,53 <sup>b</sup>	3,84 <sup>b</sup>	3,99 <sup>a</sup>
	Raíces	6,13 <sup>a</sup>	5,13 <sup>a</sup>	5,97 <sup>a</sup>	5,28 <sup>a</sup>	5,69 <sup>b</sup>
	Suelo	5,34 <sup>b</sup>	5,68 <sup>a</sup>	5,21 <sup>ab</sup>	5,52 <sup>a</sup>	5,43 <sup>b</sup>
<i>P. maximum</i>	Hojas	6,04	6,05	6,42	5,83	5,55
	Raíces	5,41 <sup>b</sup>	5,27 <sup>a</sup>	4,93 <sup>b</sup>	4,86 <sup>b</sup>	4,15 <sup>b</sup>
	Suelo	5,34 <sup>b</sup>	5,41 <sup>a</sup>	4,94 <sup>b</sup>	4,93 <sup>b</sup>	4,62 <sup>ab</sup>

a,b,c valores con superíndices no comunes en una misma fila difieren a  $P < 0,05$

Lo anterior puede ser atribuido a que estos microorganismos endófitos encuentran en los tejidos foliares un ambiente más favorecido por los fotosintatos que están disponibles para ellos (Rodrigues *et al.*, 2006). Según Brasil *et al.* (2005) la población de *Azospirillum* en las hojas está altamente correlacionada con la producción de materia seca foliar, lo cual sugiere que los nutrientes están presentes en mayor concentración

en los períodos intermitentes de sequía, por lo que las bacterias que llegan a colonizar el tallo y las hojas pueden tener acceso a los fotoasimilados allí producidos y sobrevivir en condiciones de estrés ambiental (Reis *et al.*, 2000).

*Efecto de la época climática en la población de bacterias diazotróficas.* La época de lluvia favoreció significativamente ( $P \leq 0,05$ ) las poblaciones de diazotróficas microaerofílicas (excepto la de *Gluconacetobacter* en medio semisólido LGI-P) y también las diazotróficas de vida libre con respecto a la época de sequía que se presenta en el Valle y la Sabana del Cesar (tablas 5 y 6).

Tabla 5. Unidades formadoras de colonias (UFC  $g^{-1}$ ) de diazotróficas microaerofílicas en la época de lluvia y de sequía en tres pastos.

Table 5. Colony forming units (CFU  $g^{-1}$ ) of microaerophilic diazotrophs in the rainy and dry season in three pastures.

Época climática	<i>Azospirillum</i> (NFb)	<i>A. amazonense</i> (LGI)	<i>Herbaspirillum</i> (JNFb)	<i>Burkholderia</i> (JMV)	<i>Gluconacetobacter</i> (LGI-P)
Lluvia	6,24 <sup>a</sup>	5,84 <sup>a</sup>	5,93 <sup>a</sup>	5,69 <sup>a</sup>	4,90 <sup>a</sup>
Sequía	5,47 <sup>b</sup>	5,38 <sup>b</sup>	5,09 <sup>b</sup>	4,51 <sup>b</sup>	4,89 <sup>a</sup>

Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias de tres repeticiones. Medias seguidas con la misma letra en cada medio evaluado no presentan diferencias significativas entre sí por el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

Tabla 6. Número de células ( $g^{-1}$ ) de diazotróficas de vida libre en la época de lluvia y de sequía en tres pastos.

Table 6. Number of cells ( $g^{-1}$ ) of free-living diazotrophs in the rainy and dry season in three pastures.

Época climática	<i>Azotobacter</i> (LG)	<i>Derxia</i> (LGD)	<i>Beijerinckia</i> (BEIJ)
Lluvia	5,92 <sup>a</sup>	6,16 <sup>a</sup>	5,37 <sup>a</sup>
Sequía	5,51 <sup>b</sup>	5,30 <sup>b</sup>	5,20 <sup>b</sup>

Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias de tres repeticiones. Medias seguidas con la misma letra en cada medio evaluado no presentan diferencias significativas entre sí por el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

También se observó que las poblaciones de bacterias microaerofílicas disminuyeron significativamente ( $P \leq 0,05$ ) en la época de sequía, en los tres pastos evaluados, cuando se utilizó el medio semisólido NFb que permite el recuento de *Azospirillum* (tabla 7). Los demás géneros bacterianos no mostraron influencia significativa en la interacción entre los factores época climática y especie de pasto en el Valle y Sabana del Cesar; sin embargo, la población, en la época de sequía, en general, registró valores inferiores.

Tabla 7. Población de diazotróficas microaerofílicas en NFb (*Azospirillum*) y diazotróficas de vida libre en la época de lluvia y de sequía.

Table 7. Population of microaerophilic diazotrophs in NFb (*Azospirillum*) and free-living diazotrophs in the rainy and dry season.

Pasto	<i>Azospirillum</i> (NFb)		<i>Azotobacter</i> (LG)		<i>Derxia</i> (LGD)		<i>Beijerinckia</i> (BEIJ)	
	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía	Lluvia	Sequía
<i>D. aristatum</i>	6,71 <sup>a</sup>	5,57 <sup>ab</sup>	4,82 <sup>b</sup>	4,82 <sup>c</sup>	6,03	4,69 <sup>b</sup>	4,82 <sup>b</sup>	4,84 <sup>b</sup>
<i>Brachiaria</i> sp.	5,98 <sup>b</sup>	5,68 <sup>a</sup>	6,25 <sup>a</sup>	5,50 <sup>b</sup>	6,24	5,0 <sup>b</sup>	5,30 <sup>a</sup>	5,30 <sup>a</sup>
<i>P. maximum</i>	6,02 <sup>b</sup>	5,16 <sup>b</sup>	6,70 <sup>a</sup>	6,20 <sup>a</sup>	6,20	6,10 <sup>a</sup>	5,99 <sup>a</sup>	5,46 <sup>a</sup>

Análisis estadísticos con datos transformados en Log. Medias de tres repeticiones  $\pm$  ES. Medias seguidas con la misma letra en cada época y medio evaluado no presentan diferencia significativa entre sí por el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

La disminución de la población celular en la época de sequía pudo deberse a que las condiciones ambientales generan estrés en los tejidos vegetales, lo cual no favorece la producción de exudados que pudieran ser aprovechados por las poblaciones de bacterias diazotróficas presentes en la rizosfera, las raíces y las hojas de los tres pastos cultivados (Bürgmann *et al.*, 2005; Texeira *et al.*, 2005). Oliveira *et al.* (2004) determinaron que el aumento en la humedad del suelo favoreció el crecimiento, el mantenimiento de la

población y la migración de los microorganismos diazotróficos en diferentes cultivos evaluados en Brasil, lo que puede estar relacionado con diferentes mecanismos. Entre los mecanismos utilizados por diferentes géneros de bacterias diazotróficas para sobrevivir en condiciones desfavorables se encuentran la formación de quistes, la floculación, la producción de melanina, la síntesis de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y la síntesis de polisacáridos (Joe *et al.*, 2009).

Cuando se analizó el efecto de las épocas de lluvia y sequía en las poblaciones presentes en los diferentes estratos de los pastos, se observó que las hojas no presentaron una disminución significativa ( $P \leq 0,05$ ) en la población de las bacterias microaerofílicas; ello evidencia su comportamiento endófito y demuestra, además, la acumulación de nutrientes disponibles en el tejido foliar para su supervivencia en esta condición de estrés ambiental (tabla 8).

Melloni *et al.* (2004), en un estudio sobre la densidad y la diversidad fenotípica de las bacterias diazotróficas endofíticas en suelos de minas en rehabilitación, demostraron que las condiciones del suelo, los tipos de vegetación y la época climática durante el muestreo afectaron las poblaciones de *Azospirillum* y *Herbaspirillum*. Esto pudo ser determinado en el presente estudio, en el que se encontraron diferencias en las poblaciones de acuerdo con el tipo de pasto, la época climática y el estrato de la planta donde se realizó el muestreo.

En general, las épocas de lluvia y sequía a las que se encuentra sometido el departamento del Cesar, influyeron en el número de bacterias diazotróficas asociadas a las tres especies de pastos. En la época de sequía se observó una disminución del número de bacterias en las raíces y en el suelo rizosférico, y su población se mantuvo en las hojas; ello quizás se debió a una migración de la bacteria dentro de la planta para buscar lugares con mayor humedad. Sin embargo, su presencia demuestra que pueden soportar estas condiciones de estrés ambiental, lo cual indica la necesidad de aumentar su población a través de la inoculación y de prácticas agronómicas conservacionistas.

### Agradecimientos

Al Laboratorio de Microbiología de Suelos y a la Estación Experimental Motilonia de CORPOICA por su colaboración y apoyo económico a través del proyecto financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, la Federación Colombiana de Ganaderos –FEDEGAN- y la Gobernación del Departamento del Cesar.

### Referencias bibliográficas

- Baca, B. *et al.* 2000. Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*. 1:39
- Brasil, M. *et al.* 2005. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. *Rev. Bras. Cienc. Solo*. 29:179
- Bürgmann, H. *et al.* 2005. Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environ. Microbiol.* 7 (11):1711
- Döbereiner, J. *et al.* 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa-CNPAB, Brasil. 60 p.
- Joe, M.M. *et al.* 2009. Co-aggregation in *Azospirillum brasilense* MTCC-125 with other PGPR strains: Effect of physical and chemical factors and stress endurance ability. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 40:491
- Melloni, R. *et al.* 2004. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxite, em reabilitação. *Rev. Bras. Cienc. Solo*. 28:85
- Oliveira, A. *et al.* 2004. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35:295
- Reis-Junior, F. *et al.* 2000. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesq Agropec Bras*. 35 (5):985

- Reis-Junior, F. *et al.* 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Rev. Bras. Cienc. Solo.* 28:103
- Rodrigues, L. *et al.* 2006. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos generos *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. *Pesq. Agropec. Bras.* 41 (2):275
- Texeira, M. *et al.* 2005. Diversidade de bactérias edofíticas na cultura da mandioca. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento-Embrapa.* No. 33, 22 p.

Recibido el 22 de abril del 2009

Aceptado el 11 de mayo del 2010

## Effect of the edaphoclimatic factors and pasture species on the diversity of diazotrophic bacteria

### Abstract

In order to study the diversity of diazotrophic bacteria associated to soils and cultivated pastures in the Cesar Valley and Savanna microregions, the recounts of the bacteria genera (*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Derxia*, *Beijerinckia* and *Azotobacter*) associated to three grasses (*Panicum maximum*, *Dichanthium aristatum* and *Brachiaria* sp.) were made in two seasons (rainy and dry season). The recount was made from samples of rhizospheric soil, roots and leaves in solid (LG, LGD and BEIJERINCKIA) and semisolid specific culture media (NFb, LGI, JNFb, JMV, LGI-P), using a divided plot design with a 3 (pasture species) x 3 (strata) x 2 (seasons) factorial arrangement. The results showed that the drought condition influenced the number of diazotrophic bacteria present in the three grasses used in cattle feeding in the Cesar Valley and Savanna, Colombia. In the dry season a decrease was observed in the number of bacteria in the root and soil.

Key words: *Brachiaria* sp., diazotrophic bacteria, *Dichanthium aristatum*, nitrogen fixation, *Panicum maximu*

### Introduction

In the department of Cesar approximately 1 500 000 ha are dedicated to livestock production, with a cattle population of 1 450 000 heads which contribute a daily production of 900 000 L of milk. However, this economic activity is limited by a process of prairie degradation which is manifested in the low forage production and quality, a situation derived from the soil fertility loss, which according to Oliveira *et al.* (2004) is associated to the N availability. In order to supply the deficiency of this nutrient the synthesis nitrogen fertilization has been recommended, which is not viable due to the high environmental, economic and social costs.

Nitrogen biological fixation constitutes the main way of incorporating N to the ecosystem, which is constantly recycled towards the atmosphere mainly by the action of denitrifying organisms in the soil (Baca *et al.*, 2000). In this sense, as technological choice the utilization of nitrogen-fixing native microorganisms is foreseen in order to reduce the application of nitrogen fertilization of synthesis, diminish the contamination of soils and groundwater, lower the production costs and improve the competitiveness of livestock production systems. For this purpose the isolation and multiplication processes of diazotrophic microorganisms have been used in nitrogen-free culture media; in this sense, semisolid media have been the key for the isolation of a large number of associative diazotrophs (Döbereiner *et al.*, 1995).

In the Cesar department there are not evaluation studies of nitrogen-fixing microorganism populations associated to pastures or their dynamics. This has special importance, taking into consideration that the microbial population is conditioned by the native population and it is possible that the different pasture species can show a selective effect on it. This fact could result in different responses regarding the contribution of biological nitrogen fixation by each one of these microorganisms (Reis *et al.*, 2004). The objective of this work was to evaluate the diversity of diazotrophic bacteria and their interaction with different grasses during the climatic changes that occur in the Cesar department.

### Materials and Methods

*Study area.* The Cesar Valley microregion located between 9°34' and 11°11' latitude north and 74°4' and 72°31' longitude west of the Greenwich meridian, in the Cesar department, has an extension of 1 038 052 ha, where the *Panicum maximum* and *Dichanthium aristatum* crops are established, on soils with pH 6,6 and an organic matter content lower than 2%, which is considered low. Meanwhile the Cesar savanna (507 457 ha), established with *Brachiaria* sp., has soils with pH 4,5 and moderate organic matter content (2-2,5%). This study was conducted in farms of the Chiriguana and Agustín Codazzi municipalities, representative of the



edaphoclimatic conditions of the Cesar Savanna and Valley microregions, livestock production zones of the Cesar department.

*Determination of the effect of two seasons on the populations of diazotrophic bacteria in pastures of the Cesar Valley and Savanna.* Samples of rhizospheric soil and the whole plant of Guinea grass were taken in the rainy season in September, 2006 (158,6 mm rainfall and 28,1°C temperature) and in the dry season in February, 2007 (0 mm rainfall and 31° C temperature). Two pasture species were sampled in the valley zone (*P. maximum* and *D. aristatum*) and one in the savanna (*Brachiaria* sp.), at 20 cm of depth; five subsamples were obtained of 200 g each, which were homogenized to form a sample that was processed in the laboratory of Soil Microbiology of the Center of Biotechnology and Bioindustry (Corpoica, C. I. Tibaitatá).

The rhizospheric soil was obtained by removing it from the roots, from which dilutions were made until  $10^{-6}$  in saline solution at 0,85% of NaCl. Of each dilution 0,1 mL were inoculated in three vials of semi-selective semisolid medium NFb, LGI, JNFb, LGI-P and JMV for the isolation of *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* and *Burkholderia*, respectively (Döbereiner *et al.*, 1995) as representative of the associative microaerophilic diazotrophic bacteria. Likewise, 100 µL were inoculated in boxes of LG agar for the recount of *Azotobacter*, LGD for *Derxia* and *Beijerinckia* (BEIJ) for *Beijerinckia*, free-living diazotrophic bacteria (Döbereiner *et al.*, 1995).

The roots were washed, cut in fragments and disinfected with 70° alcohol during 1 min., afterwards, they were submerged in sodium hypochlorite at 2% (2 min.) and rinsed twice in sterile water. One gram of these roots was weighed and macerated in 9 mL of sterile saline solution (0,85% of NaCl). The leaves and stems were washed with distilled water and dried. One gram of this plant material cut in fragments was weighed, and disinfected with 70° alcohol and macerated in 9 mL of sterile saline solution (0,85% of NaCl). Seriated dilutions were made until  $10^{-6}$  from these macerates and were inoculated in semisolid media (NFb, LGI, JNFb, LGI-P and JMV), in the same way as the rhizospheric soil sample. The inoculated vials were incubated for five days at 32°C, until the formation of a subsurface film as indicator of positive growth. The population of microaerophilic diazotrophs was quantified through the Most Probable Number method for three tubes, applying McCrady's table (Döbereiner *et al.*, 1995). The experimental design was in divided plots with 2 (seasons) x 3 (pasture species) x 3 (strata) factorial arrangement and three repetitions; a variance analysis was made and Duncan's comparison test was used at 5% probability, using the statistical program SAS version 9.1.3. The variance analysis for free-living diazotrophs was carried out under the same experimental design of 2 (seasons) x 3 (pasture species).

## Results and Discussion

According to the variance analysis, significant differences were found ( $P \leq 0,05$ ) for the different edaphoclimatic conditions and the three pasture genera of the Cesar Valley and Savanna, in the populations of some microaerophilic and free-living diazotrophic bacteria genera (table 1).

*Populations of diazotrophic bacteria in three pastures of the Cesar Valley and Savanna.* The factor cultivated pasture species had significant influence on the population of microaerophilic bacteria of the *Azospirillum* genus in semisolid medium NFb and *Herbaspirillum* in semisolid medium JNFb; a higher value was observed in the pasture *D. aristatum*, as compared to *Brachiaria* sp. and *P. maximum* (table 2). On the other hand, the three bacterial genera of free-living diazotrophs showed significant differences according to the cultivated pasture species and the highest values were recorded in *P. maximum*, followed by *Brachiaria* sp. and *D. aristatum* (table 3).

These results coincide with the reports made by Rodrigues *et al.* (2006), who observed that the populations of diazotrophic bacteria differed according to the cultivated rice varieties and the soil types where the studies were conducted. Likewise, Reis *et al.* (2000) isolated bacteria from the genera *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* and *Herbaspirillum* in four sugarcane genotypes, and found variations in the populations of these microorganisms according to the genotype under study. This allows to state that the plant species as well as its varieties influence directly the populations of diazotrophic microorganisms, which favors the growth of different genera, in agreement with the characteristics of the microhabitat developed in a plant, according to its photosynthetic efficiency, nutrient availability, resistance to unfavorable conditions, production of exudates, soil pH and organic matter, among other characteristics (Bürgmann *et al.*, 2005).

When the diazotrophic populations were analyzed in the three strata (rhizospheric soil, roots and leaves) in which only the microaerophilic genera (which are also considered endophyte microorganisms capable of colonizing the interior of root and leaf tissues) were studied, differences ( $P \leq 0,05$ ) were found for the population of bacteria in the leaves of *D. aristatum* and *P. maximum*, which showed the highest value with regards to the roots and the rhizospheric soil. However, in *Brachiaria* sp. the roots recorded the highest bacterial population (table 4).

The above-explained can be ascribed to the fact that these endophyte microorganisms find in the leaf tissues a most favored environment for the photosynthates that are available for them (Rodrigues *et al.*, 2006). According to Brasil *et al.* (2005) the *Azospirillum* population in the leaves is highly correlated to the leaf dry matter production, suggesting that the nutrients are present in higher concentration in the intermittent drought periods, for which the bacteria that colonize the stem and leaves can have access to the photoassimilates produced there and survive under environmental stress conditions (Reis *et al.*, 2000).

*Effect of the season on the population of diazotrophic bacteria.* The rainy season significantly ( $P \leq 0,05$ ) favored the populations of microaerophilic diazotrophs (except that of *Gluconacetobacter* in semisolid medium LGI-P) and also the free-living diazotrophs with regards to the dry season of the Cesar Valley and savanna (tables 5 and 6).

The populations of microaerophilic bacteria were also observed to decrease significantly ( $P \leq 0,05$ ) in the dry season, in the three evaluated pastures, when the semisolid medium NFb, which allows the recount of *Azospirillum*, was used (table 7). The other bacterial genera did not show significant influence on the interaction between the factors season and pasture species in the Cesar Valley and Savanna; however, the population, in the dry season, in general, recorded lower values.

The decrease of the cellular population in the dry season could have occurred due to the fact that the environmental conditions generate stress in plant tissues, which does not favor the production of exudates that could be utilized by the populations of diazotrophic bacteria present in the rhizosphere, roots and leaves of the three cultivated pastures (Bürgmann *et al.*, 2005; Texeira *et al.*, 2005). Oliveira *et al.* (2004) determined that the increase in soil moisture favored the growth, maintenance of the population and migration of diazotrophic microorganisms in different crops evaluated in Brazil, which can be related to different mechanisms. Among the mechanisms used by different genera of diazotrophic bacteria to survive under unfavorable conditions are: formation of cysts, flocculation, melanin production, synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) and synthesis of polysaccharides (Joe *et al.*, 2009).

When the effect of the rainy and dry seasons on the populations present in the different strata of pastures was analyzed, it was observed that the leaves did not show a significant decrease ( $P \leq 0,05$ ) in the population of microaerophilic bacteria; this proves their endophyte performance and also the accumulation of available nutrients in the leaf tissue for their survival under this environmental stress condition (table 8).

Melloni *et al.* (2004), in a study about the density and phenotypical diversity of endophyte diazotrophic bacteria on soils of rehabilitating mines, proved that the soil conditions, vegetation types and season during the sampling affected the populations of *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. This could be determined in this study, in which differences were found in the populations according to the pasture type, season and plant strata where the sampling was made.

In general, the rainy and dry seasons to which the Cesar department is subject, influenced the number of diazotrophic bacteria associated to the three pasture species. In the dry season a decrease was observed of the number of bacteria in the root and the rhizospheric soil, and their population was maintained in the leaves; this was probably due to a migration of the bacteria within the plant to find places with higher moisture. Yet, their presence shows that they can stand these environmental stress conditions, which indicates the need to increase their population through inoculation and conservationist agronomic practices.

### **Acknowledgements**

To the Laboratory of Soil Microbiology and the Experimental Station Motilonia of CORPOICA for their collaboration and economic support through the project funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development of the Republic of Colombia, the Colombian Federation of Livestock Producers –FEDEGAN– and the Government of the Cesar Department.